

UNTERSUCHUNGEN ZUR INSULIN-BIOSYNTHESE AM ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENPANKREAS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingrid Brunner

aus Falkensee

Berlin 1971

UNTERSUCHUNGEN ZUR INSULIN-BIOSYNTHESE AM ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENPANKREAS

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ingrid Brunner

aus Falkensee

Berlin 1971



1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Dr. E. Gerhards

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Urich

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1971

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. E. G e r h a r d s im Forschungszentrum der Schering AG, Berlin durchgeführt. Die Anregungen, die ich in gemeinsamen Gesprächen mit Herrn Dr. Dr. G e r h a r d s erhielt, prägten in entscheidendem Maße die Gestalt der Arbeit. Desweiteren wurde durch seine Bemühungen die materielle Förderung der Arbeit in jeder Hinsicht durch die Schering AG gesichert.

Die fortlaufende Betreuung lag in den Händen von Herrn Dr. H.-P. A n d e r s von der Schering AG. Durch Kritik und Rat war er mit der Arbeit ständig verbunden.

Es halfen mir Frl. M. R ü h l durch geschickte Assistenz bei der Durchführung der Perfusionsversuche, sowie Herr S. R a d a u durch technische Ratschläge bei der Disc-Elektrophorese.

Den Kontakt zur Universität wahrte ich über Herrn Prof. Dr. K. U r i c h vom II. Zoologischen Institut der Freien Universität, der dem Fortgang der Arbeit aufmerksames Interesse entgegenbrachte. Seine Kritik beeinflusste die endgültige Fassung der Arbeit.

Durch Herrn Prof. F.W. W o l f f , M.D., Institutsleiter der Hyman Research Foundation of the Washington Hospital Center, eröffnete sich für mich die Möglichkeit, unter Anleitung von Herrn J.C. P e n h o s , M.D., in der von ihm geleiteten Forschungsgruppe mit der Technik der Pankreasperfusion vertraut zu werden.

Für die Hilfe und Unterstützung, die mir auf diese Art von verschiedenster Seite zuteil wurde, möchte ich an dieser Stelle meinen tiefen Dank aussprechen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2. 1. Material	4
2. 2. Tiermaterial	4
2. 3. Immunologische Insulin-Bestimmung	4
2. 4. Radioaktivitätsmessung in Lösung	5
2. 5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	5
2. 6. Trypsin-Verdauung	5
2. 7. Versuchsaufbau	6
2. 8. Operation	8
2. 9. Aufarbeitung des Pankreas	11
2.10. Aufarbeitung des Mediums	13
3. Ergebnisse	
3. 1. Sekretion von immunologisch reaktivem Insulin	15
3. 2. Einbau von ^3H -Leucin in TCE-unlösliches Material in Abhängigkeit von der Perfu- sionszeit	17
3. 3. Charakterisierung der Proinsulin- und Insulin-Fraktionen	21
3. 4. Einbau von ^3H -Leucin in TCE-unlösliches Material in Abhängigkeit von der Glucose- konzentration	27
3. 5. Sekretion von ^3H -markiertem Proinsulin und Insulin	31
3. 6. Inkorporationsversuche in vivo: Einbau von ^3H -Leucin in TCE-unlösliches Material des Rattenpankreas	34
4. Diskussion	36
5. Zusammenfassung	40
6. Literaturhinweise	41

1. Einleitung

Steiner zeigte, daß die Biosynthese von Insulin über eine einkettige Vorstufe, das Proinsulin, verläuft. Dieses wird durch Abspaltung eines Peptids (C-Peptid), welches das COOH-Ende der B-Kette mit dem NH₂-Ende der A-Kette verbindet, in Insulin umgewandelt (1-3). Die Existenz des Proinsulins als Vorstufe des Insulins wurde bereits in verschiedenen Systemen nachgewiesen: mit Schnitten von menschlichen Inselzelltumoren (1) und foetalem Rinderpankreas (4), mit Inselzellgewebe des Kabeljaus (5), sowie mit isolierten Inselzellen der Ratte (2) und des chinesischen Streifenhamsters (6).

Die Wirkung der Glucose auf die Insulin-Synthese variiert in den oben genannten Systemen. Pankreasschnitte und isolierte Langerhans'sche Inseln von Rind, Ratte und Kaninchen inkorporierten bei erhöhter Glucosekonzentration vermehrt markierte Aminosäuren in Insulin (7-14). Dagegen hat Glucose keinen Einfluß auf den Einbau markierter Aminosäuren in das Inselzellgewebe (Brookmanbodies) der Teleostier (5,15-17).

Über die Sekretion von neu-synthetisiertem Insulin ist bisher nur wenig bekannt. Nach einer Inkorporationszeit von 30-90 min wurde aus Kaninchen-Pankreasschnitten markiertes Insulin sezerniert (8). Die spezifische Aktivität war bei Stimulation mit hohen Glucosekonzentrationen infolge der gesteigerten Sekretion von markiertem Insulin geringer als bei niedriger Konzentration. Clark und Stei-

ner berichteten über vorläufige Versuche mit isolierten Ratten-Inselzellen, nach denen die Sekretion von neu-synthetisiertem Insulin und Proinsulin durch hohe Glucosekonzentrationen stimuliert wird (14). Ähnliche Ergebnisse erhielten Burr et al. (18) an perfundierten Pankreasstücken. Sie konnten nach 30-40 min sezerniertes Proinsulin im Medium nachweisen. Bei konstanter Stimulation mit 300mg% Glucose nahm der Proinsulin-Anteil des immunologisch reaktiven Insulins in Abhängigkeit von der Perfusionszeit zu.

Das isoliert perfundierte Pankreas wurde bisher überwiegend zur Untersuchung der Insulin-Sekretion benutzt. Sevier et al. (19,20) zeigten, daß das isoliert perfundierte Hundepankreas ^{14}C -markierte Aminosäuren in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration in ein insulinähnliches Produkt einbauen kann. Nach Gelfiltration von Pankreasextrakten auf Sephadex G-75 wurde dabei ^{14}C -Radioaktivität in Fraktionen gemessen, die das gleiche Elutionsvolumen besaßen wie kommerzielles Insulin. Immunologische und biologische Tests wiesen darauf hin, daß die betreffenden Fraktionen Insulinaktivität besaßen. Die Existenz einer Insulin-Vorstufe wurde in diesen Versuchen nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, daß das isoliert perfundierte Pankreas auch zur Lösung differenzierterer Fragestellungen der Insulin-Biosynthese geeignet ist. Die optimale Annäherung an den physiologischen Zustand des Organismus scheint bei diesem Präparat gegeben,

dies deshalb vorteilhafter zum Studium der Insulin-Biosynthese zu sein, als die bereits eingangs erwähnten Systeme. Physikalische und chemische Eingriffe, die z.B. zur Isolierung von Inselzellen erforderlich sind, entfallen hier. Das Pankreas bleibt unverletzt und wird durch sein natürliches Gefäßsystem durchströmt.

Gefragt war, ob Proinsulin auch in diesem System nachweisbar ist und welche Zeitspanne zwischen der Synthese von Proinsulin und dessen Auftreten als Insulin nach proteolytischer Spaltung vorliegt.

Ferner sollte eine mögliche Regulation der Proinsulin - Synthese, sowie der Umwandlung von Proinsulin in Insulin durch Glucose untersucht werden.

Desweiteren war die Frage gestellt, ob das während der Perfusion synthetisierte Proinsulin und Insulin sezerniert werden.

Es sollte ein Vergleich der Insulin-Biosynthese an in vitro Systemen mit der am lebenden Organismus hergestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

L-Leucin-4,5- ^3H mit 30 C/mM, The Radiochemical Center, Amersham Buckinghamshire, England

Albumin aus Rinderserum, lyophil. rein, (Cohn Fr.V)
>95%, Serva, Heidelberg

Sephadex G-50 fine, Pharmacia Uppsala, Schweden

Kristall-Insulin R, $1\text{mg} \cong 29 \text{ I.E.}$ Op-Nr.155 C028, Farbwerke Höchst AG, Frankfurt

Puromycin pharm., Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

Trypsin-TPCK, 270 U/mg, 96% Protein, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, USA

Insulin-Immunoassay Kit: Code IM.39, Insulin - ^{125}J enthält als Minimum $50 \mu\text{C/g}$, Membran-Filter: Code N.50, The Radiochemical Center, Amersham Buckinghamshire, England

Heparin, 1000E/mg, Teerchemie Hamburg

Streptozytozin, Upjohn Comp., Kalamazoo, Mich., USA

Visking-Dialysierschlauch, Typ 27/32, Serva, Heidelberg

2.2. Tiermaterial: Männliche Wistar-Ratten

Futter: Altromin-R, Altrogge, Lage Lippe

2.3. Die immunologische Insulin-Bestimmung erfolgte nach der Doppel-Antikörper-Methode von Hales und Randle (21) mit Hilfe des Insulin-Immunoassay Kits. Wegen des ^3H -Gehaltes der Proben wurde die ^{125}J -Radioaktivität im Autogamma Scintillationszähler (Nuclear Chicago, Mich., USA) gemessen.

- .4. Zur Radioaktivitätsmessung in Lösung wurden 0,5ml jeder Fraktion nach Zusatz von 20ml Bray's Solution im Tri-Carb-Spektrometer aus der 3000 Serie (Packard - Instruments Corp., Ill., USA) gemessen.

.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde bei pH 8,9 mit 15% Acrylamid nach der Methode von Ornstein und Davis durchgeführt (22). Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blau-R 25 (23). Zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung im Gel wurden 1mm breite Gelscheiben 2 Stunden bei 50°C im Vakuumschrank getrocknet und 16 Stunden in 0,1ml H₂O₂ gelöst, anschließend im Scintillationszähler gemessen.

.6. Trypsin-Verdauung

Die Spaltung des Proinsulin enthaltenden Materials durch Trypsin wurde nach Steiner (1) durchgeführt. Eine entsprechende Fraktion wurde gefriergetrocknet und mit 100 µl 0,01 n HCl gelöst. Das Reaktionsgemisch bestand aus 90 µl 0,05 m Tris HCl pH 7,5, 15 µl der Proinsulinlösung und 5 µl einer Trypsinlösung in den unten angegebenen Konzentrationen. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 900 µl 1m Essigsäure und 5 µl 1n HCl wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration auf Sephadex G-50.

2.7.

Versuchsaufbau

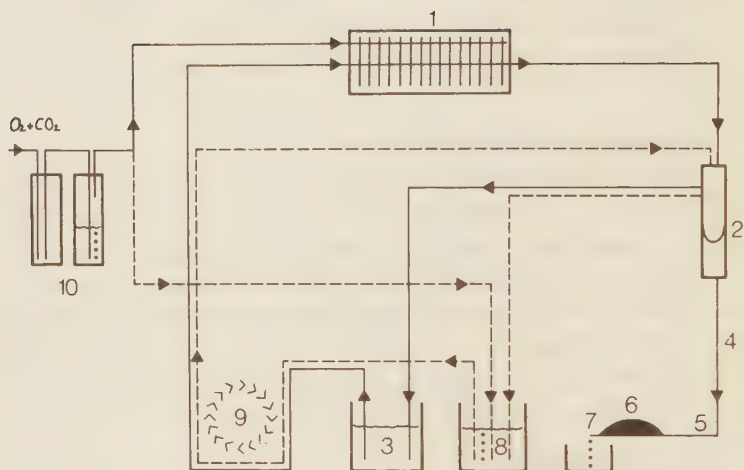


Abb.1: Schematische Darstellung der Perfusionsanlage.
 ----- Verlauf des Perfusionsmediums und des $O_2 + CO_2$ -Gemisches der Vorperfusion bzw. ——— der Hauptperfusion. Erläuterungen im Text.

Abb.1 stellt schematisch die Perfusionsanlage dar. Die im folgenden angeführten Einzelteile befinden sich in einem Holzkasten (1m x 1,20m), dessen Temperatur durch einen mit einem kontaktthermometer verbundenen Heißluftapparat auf $37^{\circ}C$ gehalten wird. Ein Oxygenator (1) dient als Reservoir für das Perfusionsmedium. kreisförmige Platten, die parallel auf einer rotierenden Welle angeordnet und mit kleinen Schaufeln versehen sind, bewirken im Oxygenator eine ständige Durchmischung des Mediums. Ein Gemisch aus 95% $O_2 + 5\% CO_2$ wird durch feine Düsen auf die rotierenden Mischplatten geblasen. Ein um den Oxygenator angebrachter Wärmemantel wird mit $37^{\circ}C$ temperiertem Wasser

mit Hilfe eines Durchflußthermostaten (Haake Thermostat F-Junior, Gerät-Nr. 69 137) durchströmt.

Vom Oxygenator fließt das Medium zu einem Überlaufgefäß (2). Es wird zum Teil in einem Sammelgefäß aufgefangen (3) und zum Oxygenator zurückgepumpt. Das durch einen Mullfilter strömende Medium gelangt durch einen Polyäthylenschlauch (4) in die anschließende Aorta-Kanüle (5). Nach Durchströmung des Pankreas (6) tropft es aus der Pfortader durch eine Kanüle (7) ab. Das Vorperfusionsmedium wird in einem Glasgefäß (8) mit 95% O₂ u. 5% CO₂ durchperlt und mit der Pumpe (9) zum Überlaufgefäß gepumpt. Es gelangt von dort über den angegebenen Weg in die Aorta.

Das aus der Pfortader tropfende Perfusionsmedium wurde in den unten angegebenen Zeitintervallen unter Eiskühlung gesammelt und zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Aliquote Teile jeder Probe wurden bei -20°C zur immunologischen Insulin-Bestimmung gelagert. Die Höhe des Überlaufgefäßes kann nach dem jeweils erforderlichen Druck verstellt werden. Dieser variiert bei einem Durchflußvolumen von 5-8ml/min zwischen 40-60mm Hg. Das Perfusionsmedium besteht aus Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB), pH 7,4 mit 4% Rinderserumalbumin, Glucose in der jeweils angegebenen Konzentration und 0,5 μ C bzw. 62,5 nC³ H-Leucin/ml KRB. Das Vorperfusionsmedium enthält kein ³H-Leucin, die Glucosekonzentration ist gesondert angegeben. Vor Beginn der Operation wird der Puffer in (3) u. (8) gefüllt und mit 95% O₂ u. 5% CO₂ begast.

2.8. Operation:

Mit Hilfe der von Penhos (24) beschriebenen Operations-technik wurde das Pankreas von den benachbarten Organen und Geweben isoliert. Das in situ verbleibende isolierte Pankreas mit angrenzendem Duodenum wurde von einer in die abdominale Aorta inserierten Kanüle mit Perfusionsmedium versorgt. Der Durchfluß erfolgte über die Arteria mesenterica und die Arteria coeliaca, welche sich in die Arteria pancreaticoduodenalis und die Arteria lienalis verzweigt. Das Perfusionsmedium tropfte aus der Vena portae durch eine Kanüle wieder ab.

Folgende Schritte mußten zur Isolierung unternommen werden. Eine gefütterte männliche Wistar-Ratte (250-300 g) wurde durch Injektion von 5mg Nembutal/100g Körpergewicht narkotisiert. Die Öffnung der Bauchhöhle erfolgte durch einen mittleren abdominalen Einschnitt von der Peniswurzel bis zum Sternum. Zur Vergrößerung des Operationsfeldes wurden die Testes mit Fettgewebe entfernt. Das Rectum wurde am analen Ende unterbunden und reseziert. Vor Entfernung des Jejunums, Iliums und Colons mußte die Arteria mesenterica superior abgebunden werden. Der das Pankreas durchströmende Teil mit seinen Verzweigungen blieb weiterhin mit Blut versorgt. Die Milzgefäße wurden am Milzhilus ligiert, die Milz abgetrennt. Es folgte die Ligierung des Oesophagus und der angrenzenden Gefäße von ihren anatomischen Verbindungen zum Magen. Eine Polyäthylen-Kanüle wurde durch den Magen-Schließmuskel von einer Einschnittsöffnung im Magen eingeschoben, eine weitere am Ende des Duodenums

inseriert. Anschließend wurde das Duodenum mit warmer physiologischer Kochsalzlösung durchspült. Zur Freilegung der abdominalen Aorta wurden die iliolumbalen, renalen, adrenalen und lumbalen Gefäße unterbunden. Oberhalb der Verzweigung der iliacaalen Gefäße wurde die Aorta und die Vena cava inferior gemeinsam ligiert. Nach Injektion von 0,5ml einer Heparin-Lösung ($\approx 1000E$) in die Vena cava inferior wurde die abdominale Aorta durch eine Arterienklemme unterhalb der Abzweigung der Arteria mesenterica verschlossen. Durch einen Einschnitt in Höhe der iliolumbalen Gefäße wurde die mit dem Perfusionssystem verbundene Polyäthylen-Kanüle in die Aorta eingeführt und die Arterienklemme entfernt. Es folgte die Unterbindung der Vena cava inferior oberhalb der renalen Gefäße und der Aorta oberhalb der Arteria coeliaca. Zur gleichen Zeit wurde die arterielle Kanüle für das einströmende Perfusionsmedium geöffnet, so daß die Sauerstoffversorgung von Pankreas und Duodenum nur kurzzeitig unterbrochen war. Sofort nach Verschluß der Aorta wurde der Rattenrumpf oberhalb des Zwerchfells abgetrennt. Nach Ligierung des gesamten Leberhilus konnte das Perfusionsmedium frei aus der in die Vena portae inserierten Kanüle abtropfen.

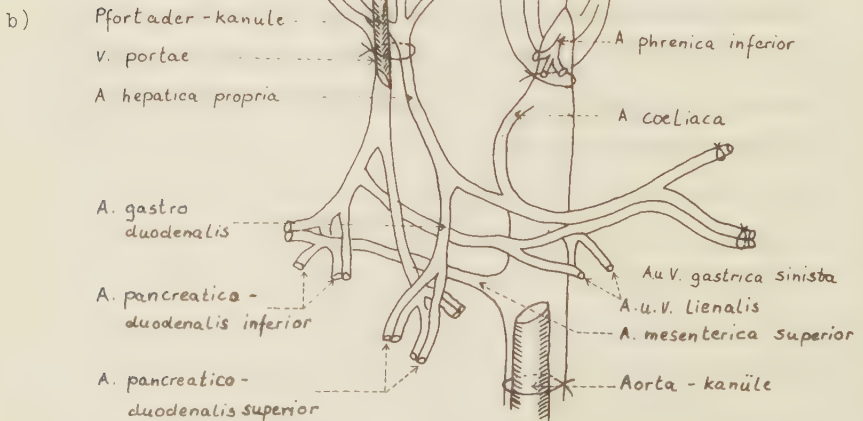
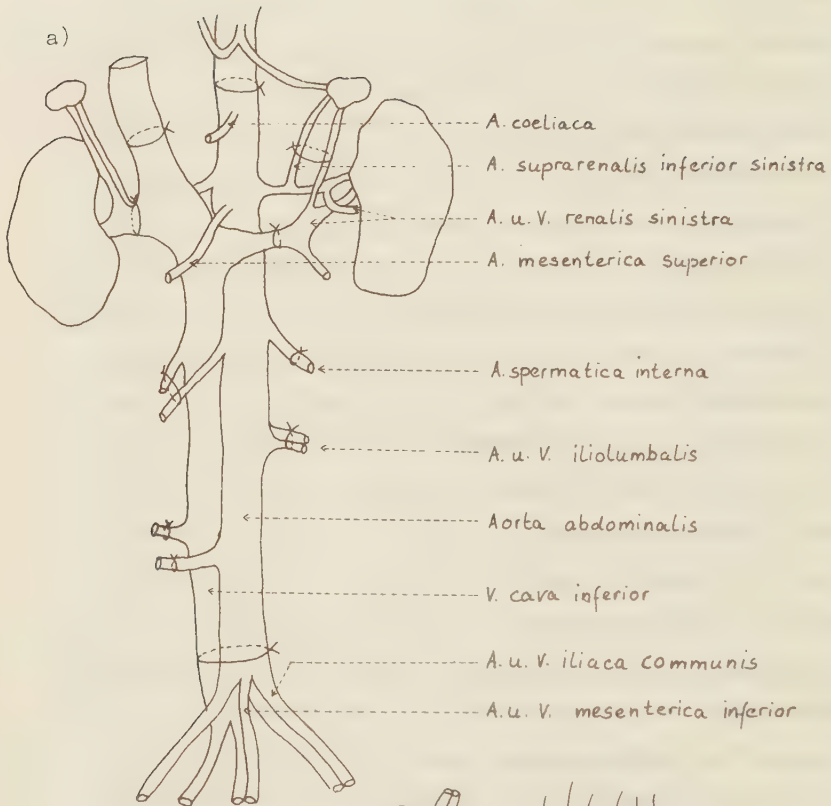


Abb.2: a) Isolierung der Aorta und der Vena cava durch Anlegen von Ligaturen. b) Gefäßsystem, das das isolierte Pankreas mit Medium versorgt. Zeichnung angelehnt an (25).

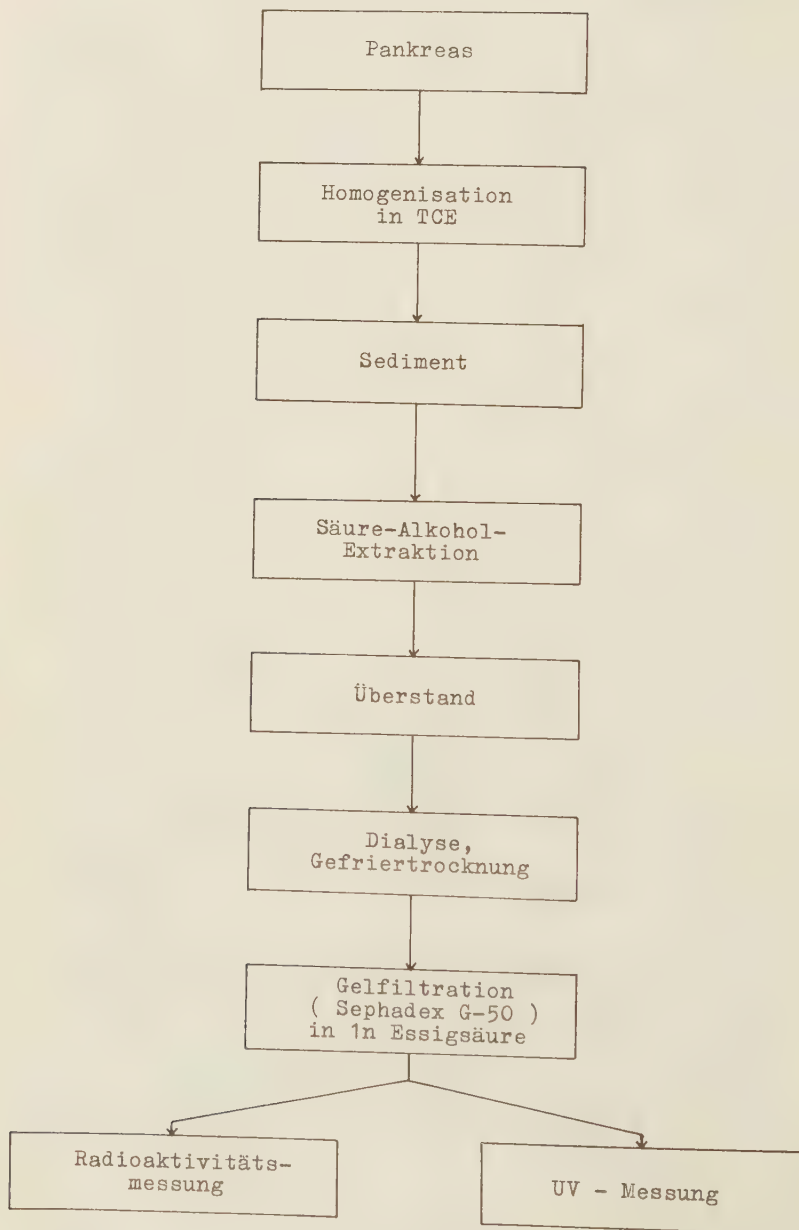
2.9. Aufarbeitung des Pankreas

Die Aufarbeitung des Pankreas erfolgte durch eine Modifikation der Methode von Tung und Yip (4).

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Pankreasgewebe mit 30ml 10% Trichloressigsäure (TCE) und 5mg Rinder-Insulin unter Eiskühlung mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei Zimmertemperatur und 1500g zentrifugiert, das Sediment dreimal mit 30ml 10% TCE gewaschen. Anschließend wurde es nach Davoren (10) zweimal mit je 30ml eines Säure-Alkohol-Gemisches (375ml 96% Äthanol, 105ml Aqua dest, 7,5ml konz. Salzsäure) 1 Stunde geschüttelt und 20 min bei Zimmertemperatur und 1500g zentrifugiert. Die vereinigten Extrakte wurden 16 Stunden bei 4°C gegen 10 l Wasser dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde 30 min bei 35000g in der Sorvall-Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, der Überstand auf etwa 10ml eingengt und anschließend gefriergetrocknet. Das Trockenprodukt wurde mit 2ml 1n Essigsäure gelöst, auf eine 1 x 90 cm Sephadex G-50 fine Säule gegeben und mit 1n Essigsäure eluiert. Die Fraktionen von 2-3ml wurden in Reagenzgläsern gesammelt. Diese waren zuvor mit einer Lösung von 2% Albumin in 5n Essigsäure benetzt und anschließend 1 Stunde bei 80°C getrocknet worden. Die Beschichtung soll Absorption von Insulin und Proinsulin an der Glaswand verhindern. In jeder Fraktion wurde die UV-Absorption bei 276nm ermittelt. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Tri-Carb-Spektrometer.

Aufarbeitung des Pankreas

Abb. 3.

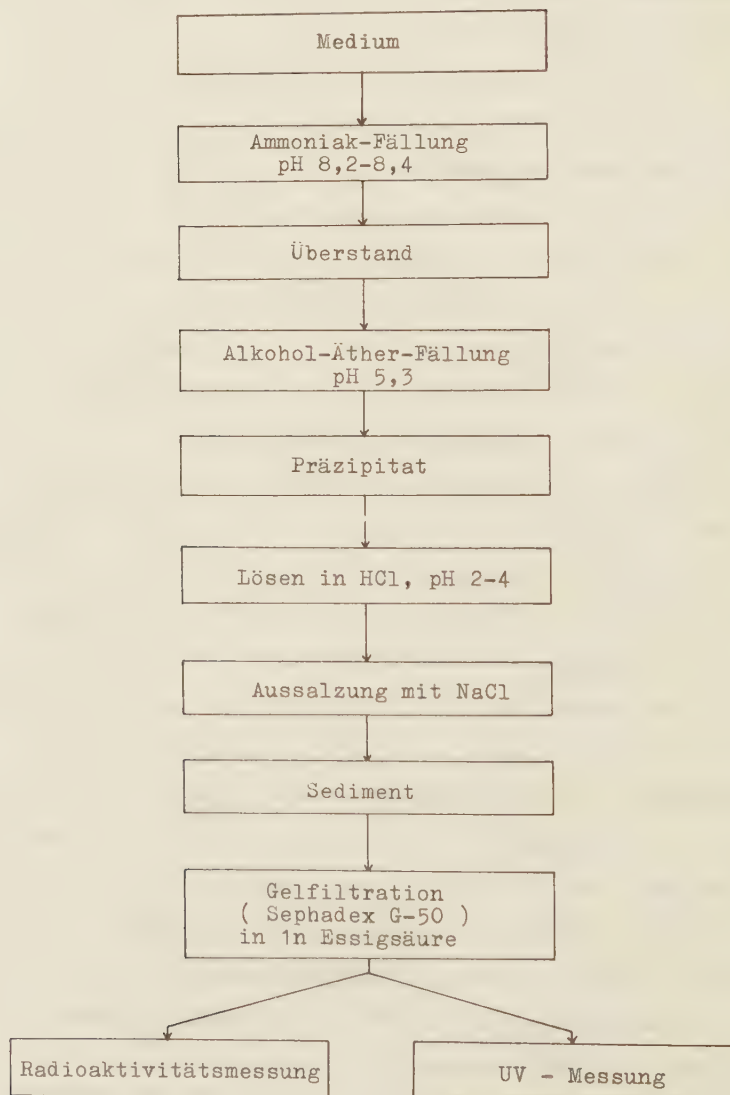


0. Aufarbeitung des Mediums:

Zur Aufarbeitung des Mediums war die zur Pankreasextraktion beschriebene Methode nicht geeignet, da sich der hohe Albumingehalt des Mediums nicht genügend abtrennen ließ. Vorteilhafter erwies sich die Davoren-Methode (26) . Das in den unten angegebenen Zeitintervallen gesammelte Perfusionsmedium wurde sofort nach Entnahme einer Probe zur immunologischen Insulin-Bestimmung mit 5mg Rinder-Insulin versetzt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens eines Säure-Alkohol-Gemisches (375ml 96% Äthanol, 7,5 ml konz. HCl) wurde der pH mit 25% Ammoniak-Lösung auf 8,2-8,4 eingestellt, das gefällte Albumin anschließend 30 min bei 22 000 g und 0°C in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 6n HCl auf pH 5,2-5,4 angesäuert. Nach Zugabe von 42 µl 2m Ammonium-Acetat-Puffer / ml KRB erfolgte die genaue Einstellung des pH 5,3. Zur Reinigung des in Lösung befindlichen Insulins schloß sich eine Alkohol-Äther-Fällung an. (Zwei Vol.96% Äthanol, vier Vol.wasserfreier Äther). Das nach 16 Stunden bei - 15°C entstandene Präzipitat wurde 30 min bei 22 000 g und - 5°C abzentrifugiert und in 2ml Wasser pro ml KRB suspendiert. Die Suspension wurde durch Zugabe von 2n HCl in eine klare Lösung vom pH 2-4 überführt. Unter konstantem Rühren wurde zu dieser Lösung innerhalb von 2-5 min eine wässrige 30% NaCl- Lösung gleichen Volumens eingetropft, das Präzipitat bei Zimmertemperatur 30 min bei 22 000 g abzentrifugiert und in 2ml Essigsäure gelöst. Es folgte eine Gelfiltration auf Sephadex G-50.

Aufarbeitung des Mediums

Abb. 4.



3. Ergebnisse

3.1. Sekretion von immunologisch reaktivem Insulin

Ein Kriterium der Funktionsfähigkeit des Pankreas ist seine vermehrte Insulin-Sekretion während Glucosestimulation. Um zu prüfen, ob das perfundierte Pankreas diese Bedingung erfüllt, wurde während einer 240 min Perfusion sezerniertes Insulin im Medium immunologisch gemessen. Das Pankreas wurde 90 min mit Perfusionsmedium ohne Glucose durchströmt, dem anschließend 400mg% Glucose zugefügt wurden. Wie in Abb.5 erkennbar, bewirkte das glucosfreie Perfusionsmedium nur eine geringe Insulin-Sekretion. Diese stieg jedoch nach Zugabe der Glucose innerhalb von 5 min zu einem Maximalwert an, der in den folgenden 20 min wieder abfiel. Danach zeigte die Sekretionsrate (μ E Insulin/min) bis zum Ende der Perfusion eine steigende Tendenz.

Die Sekretion während der Glucosestimulation weist deutlich den von Curry (27) und Basabe (28) am gleichen System, sowie von Kanazawa (29) in vivo demonstrierten diphasischen Verlauf auf. Das in dieser Arbeit zur Untersuchung der Insulin-Biosynthese dienende perfundierte Pankreas ist demnach hinsichtlich seines Sekretionsverhaltens diesen Systemen vergleichbar.

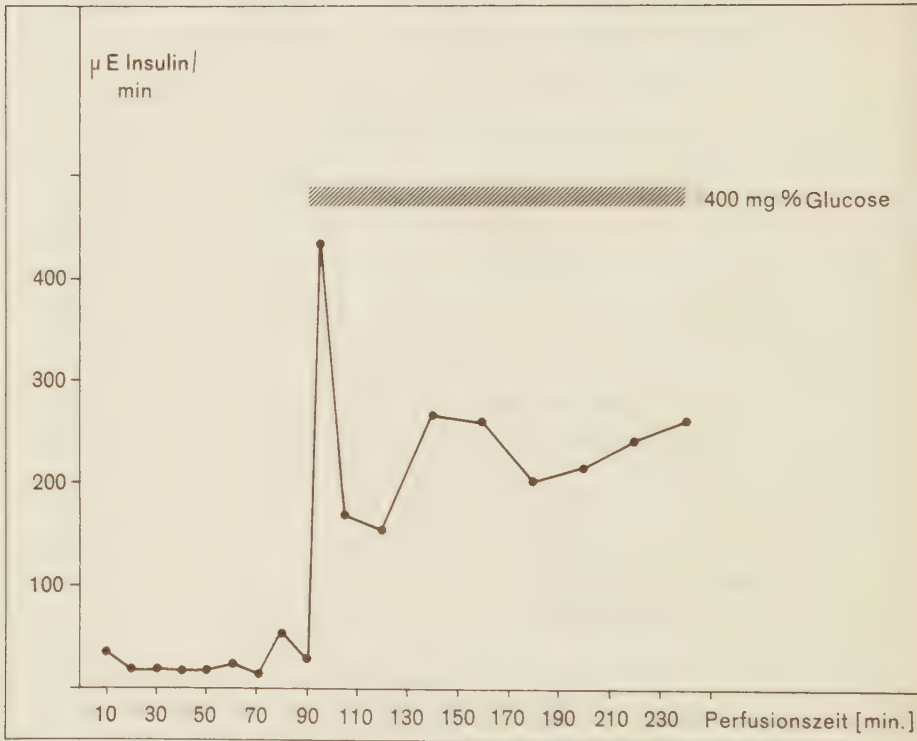
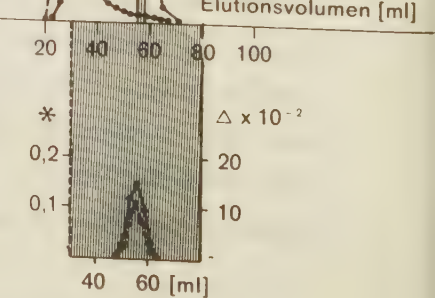
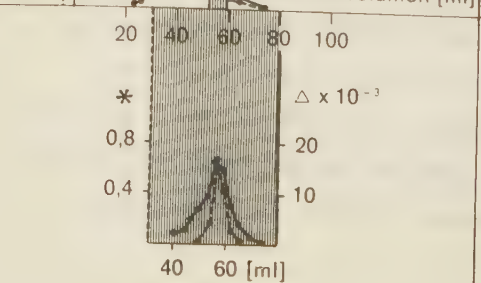
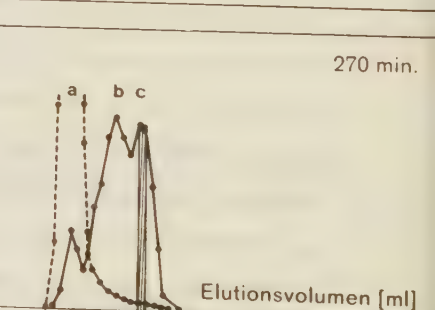
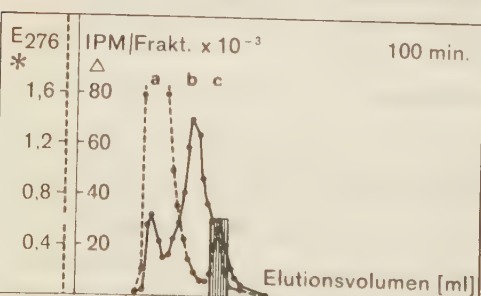
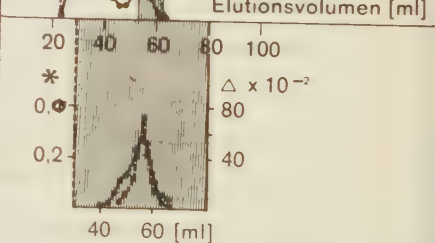
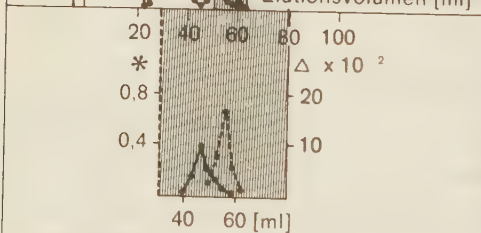
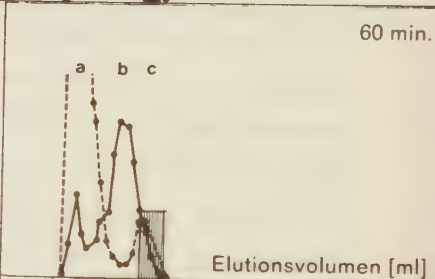
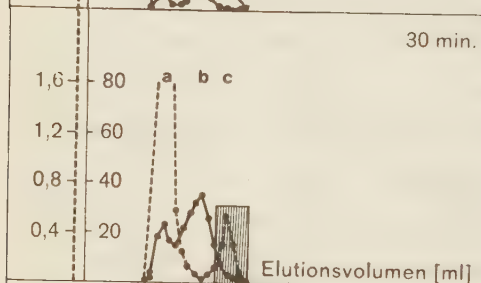
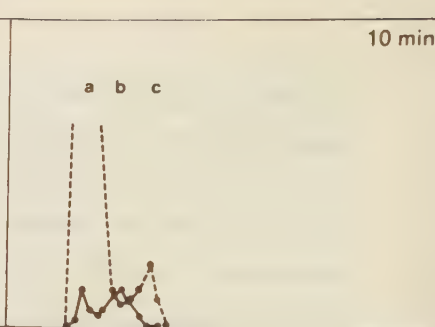
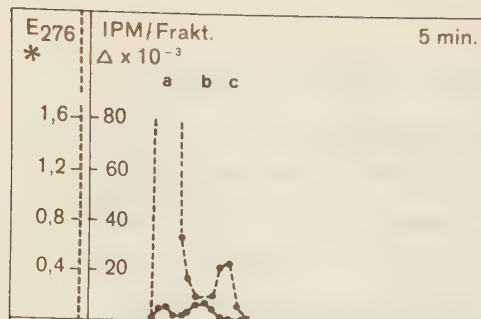


Abb.5: Sekretion von immunologisch reaktivem Insulin während einer 240 min Perfusion. Nach 90 min wurden dem Medium 400 mg% Glucose zugefügt.

3.2. Einbau von ^3H -Leucin in TCE - unlösliches Material in Abhängigkeit von der Perfusionszeit

In Abb. 6 ist die ^3H -Aktivitätsverteilung nach der Gelfiltration der Extrakte verschiedener Pankreata aufgezeichnet, die 5, 10, 30, 60, 100 und 270 min durchströmt wurden. Das Perfusionsmedium enthielt 400mg% Glucose. Bei der Gelfiltration traten drei ^3H -Aktivitätspeaks auf, die in der Abb.6 mit a, b und c bezeichnet wurden. Der Peak a wurde mit dem Vorlauf der Säule eluiert und wurde nicht weiter untersucht. Peak b zeigte das gleiche Elutionsvolumen wie das von Steiner beschriebene Proinsulin (2). Peak c deckte sich mit dem UV-Peak des zugesetzten Rinder-Insulins.

Abb.6 zeigt, daß schon nach einer Perfusionszeit von 5 min ein Einbau von ^3H -Leucin in TCE-unlösliches Material nachweisbar war. Durch Gelfiltration ließ es sich in die Peaks a und b auftrennen. Auch nach 30 min Perfusion war ^3H -Radioaktivität nach Gelfiltration des Pankreasextraktes nur in diesen Peaks nachzuweisen. Wie aus Abb.6 ersichtlich, war zwar im Insulinbereich eine geringe Radioaktivitätsmenge vorhanden. Nach Rechromatographie des Insulin-Peaks c wurde diese Radioaktivität jedoch nicht mit Rinder-Insulin eluiert. Beim 60 min-Wert wurden die dem UV-Peak des zugesetzten Insulins entsprechenden Fraktionen ein zweites Mal gelfiltrierte. Dabei stimmte der Insulin-UV-Peak mit dem Radioaktivitätspeak überein. Nach 100 min war der ^3H -Peak c bereits bei der ersten Gelfiltration als Schulter erkenntlich und wurde bei einem erneuten Lauf über Sephadex G-50 mit dem zugesetzten



Insulin eluiert. Nach einer Durchströmungszeit von 270 min zeigte der Peak c die gleiche Höhe wie Peak b. Bei diesem Versuch wurde vor der TCE-Fällung nicht wie üblich 5mg, sondern nur 100 μ g Insulin zugesetzt, um zur weiteren Charakterisierung des Peak c eine Disc-Elektrophorese zu ermöglichen. Vor der zweiten Gelfiltration wurden aliquote Teile der dem Peak c entsprechenden Fraktionen gepoolt und mit 1mg Insulin verschnitten. Die dem Peak c entsprechende radioaktive(n) Verbindung(en) verhält sich bei der Rechromatographie wieder wie zugesetztes Insulin.

Aus Abb.7 ist ersichtlich, daß die Anwesenheit von 80 μ g Puromycin/ml Perfusionsmedium während einer 60 min Durchströmung den Einbau von ^3H -Leucin praktisch vollständig hemmt. Daraus kann man schließen, daß der Einbau von ^3H -Leucin durch eine de novo Protein-Synthese erfolgt ist.

Abb.6: Verteilung der ^3H -Aktivität durch Gelfiltration von Säure-Alkohol-Extrakten aus dem perfundierten Rattenpankreas. Die Perfusionszeit ist jeweils angegeben. Das Vorperfusionsmedium enthielt 50mg% Glucose, das Perfusionsmedium 400mg% Glucose und 0,5 μC ^3H -Leucin/ml Medium.

•————• = ^3H -Aktivität (Imp/Fraktion), •————• = Extinktion des Eluats bei 276nm. Die schraffiert eingezeichneten Fraktionen wurden gepoolt und rechromatographiert.

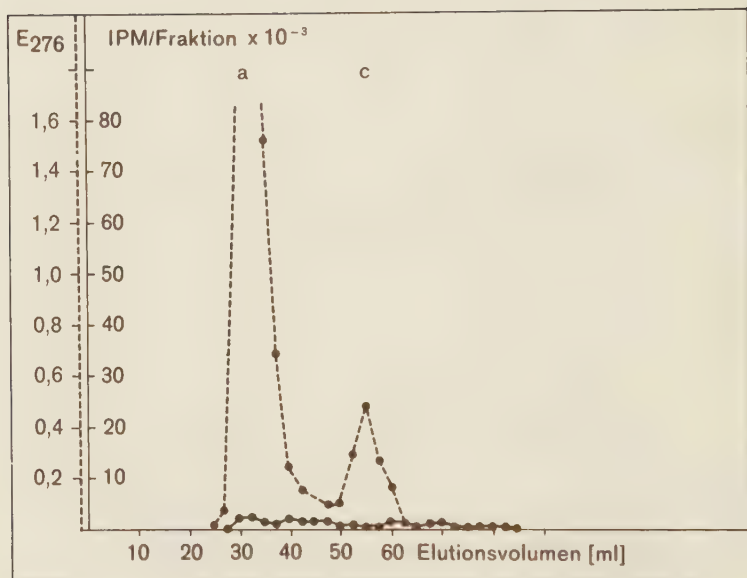


Abb.7: Hemmung des Einbaus von ³H-Leucin durch Puromycin. Die Perfusionsdauer betrug 60 min, das Perfusionsmedium enthielt 400 mg% Glucose, 8 mg% Puromycin und 0,5 μ C ³H-Leucin/ml Medium.

3.3. Charakterisierung der Proinsulin- und Insulin-Fractionen.

Gepoolte Fractionen des Peak b (Proinsulin) nach 270 min Perfusion wurden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Die Radioaktivitätsverteilung im Gel nach der Elektrophorese ist in Abb.8 dargestellt. Die Laufstrecke wird durch eine Farbbande angezeigt, die durch Zusatz von Bromphenolblau zum Elektrophorese-Puffer entsteht. Es ist erkennbar, daß die Hauptradioaktivität nach ihrem elektrophoretischen Verhalten Rinder-Proinsulin entspricht. Die zwischen Farbfront und Proinsulin liegenden Aktivitätspeaks könnten den von Steiner (14) beschriebenen Intermediärformen entsprechen.

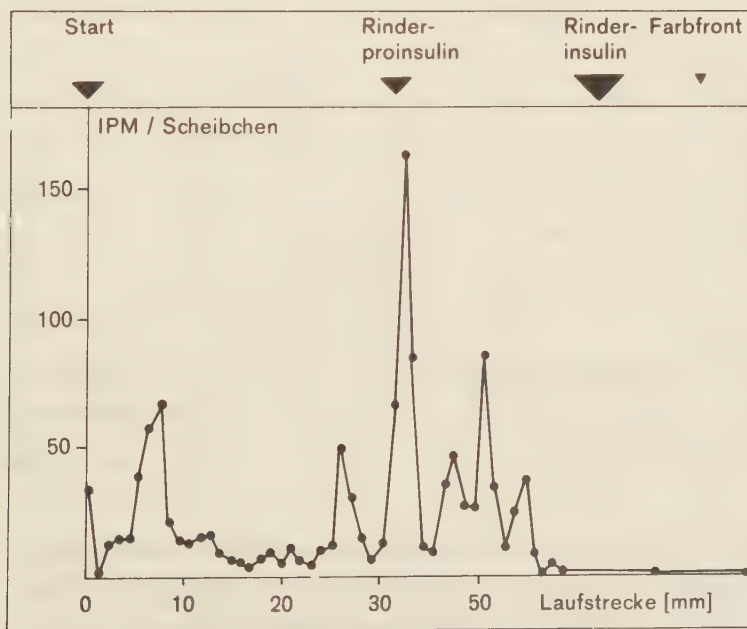


Abb.8: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Peak b nach 270 min Perfusion: Verteilung der ^3H -Radioaktivität. Als Referenzsubstanz wurde käufliches Rinder-Insulin benutzt, das stets 2-3% Proinsulin enthält. Perfusionsmedium: s.Abb.6.

Abb.9 zeigt die ^3H -Radioaktivitätsverteilung in einem Polyacrylamid-Gelelektropherogramm eines Aliquots von Peak c nach 270 min Perfusion. Die Position der Radioaktivitätspeaks I und II entsprechen nach dem elektrophoretischen Verhalten den beiden Ratten-Insulinen I und II (14).

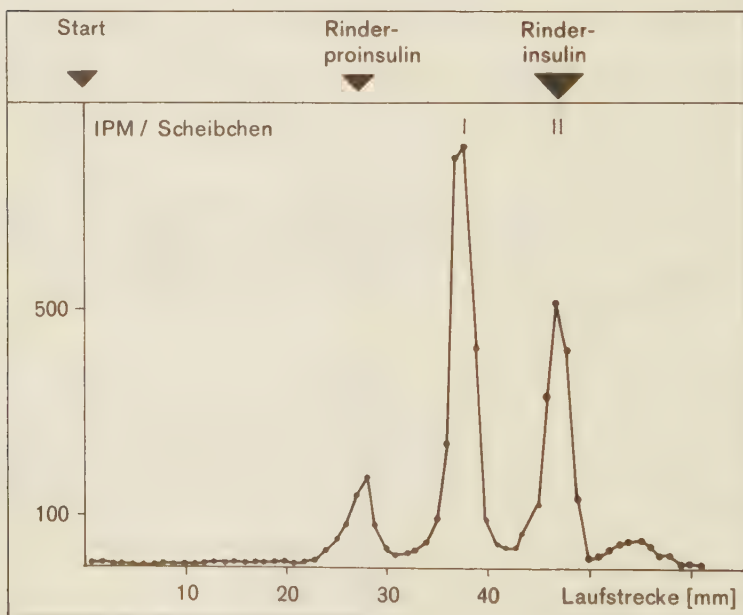


Abb.9: Polyacrylamid-Gelelektrophorese eines Aliquots von Peak c nach 270 min Perfusion: Verteilung der ^3H -Aktivität. Die Elektrophorese wurde nach Herauslaufen der Farbfront beendet, das mit der Farbfront wandernde C-Peptid wurde daher nicht erfaßt. Als Referenzsubstanz diente Rinder-Insulin.

Zur weiteren Erhärtung der Befunde, daß Peak b Proinsulin entspricht, wurde am perfundierten Pankreas die Umwandlung von Proinsulin in Insulin verfolgt. Dazu wurde nach 30 min Perfusion das Medium gewechselt, und die Perfusion 90 min mit Puromycin enthaltendem Medium ohne ^3H -Leucin fortgesetzt. (Chase-Versuch). Vor der TCE-Fällung wurden 100 μg Rinder-Insulin zugesetzt, um eine Disc-Elektrophorese von Insulin-Fractionen zu ermöglichen. Nach Abb.10 war im Insulinbereich bereits nach der ersten Gelfiltration ein deutlich abgetrennter Radioaktivitätspeak nachweisbar. Aliquote Teile der schraffiert gezeichneten Fractionen des Radioaktivitätspeaks c wurden gepoolt, mit 1 mg Rinder-Insulin verschnitten und rechromatographiert. Die Radioaktivität entsprach bei der zweiten Gelfiltration dem zugesetzten Rinder-Insulin. Wie bereits eingangs beschrieben, war nach 30 min Perfusion keine ^3H -Radioaktivität im Peak c nachweisbar. Das ^3H -markierte Material des Insulin-Peaks c muß sich demnach beim Chase-Versuch aus einer Vorstufe gebildet haben, die in den ersten 30 min der Perfusion synthetisiert wurde.

In Abb.11 ist die ^3H -Verteilung im Disc-Elektropherogramm eines aliquoten Teils des Peak c des vorstehend besprochenen Chase-Versuches wiedergegeben. Hier findet man neben den Aktivitätspeaks I und II, die gleiche Laufstrecken wie die beiden Ratten-Insuline I und II besitzen, einen Aktivitätspeak III. Dieser wandert mit dem 'tracker dye' und weist die gleiche Laufstrecke wie das C-Peptid auf (14). Diese Ergebnisse zeigen, daß am perfundierten Pankreas eine Umwandlung von Proinsulin in Insulin erfolgt.

Dieser Vorgang ist durch Puromycin nicht hemmbar.

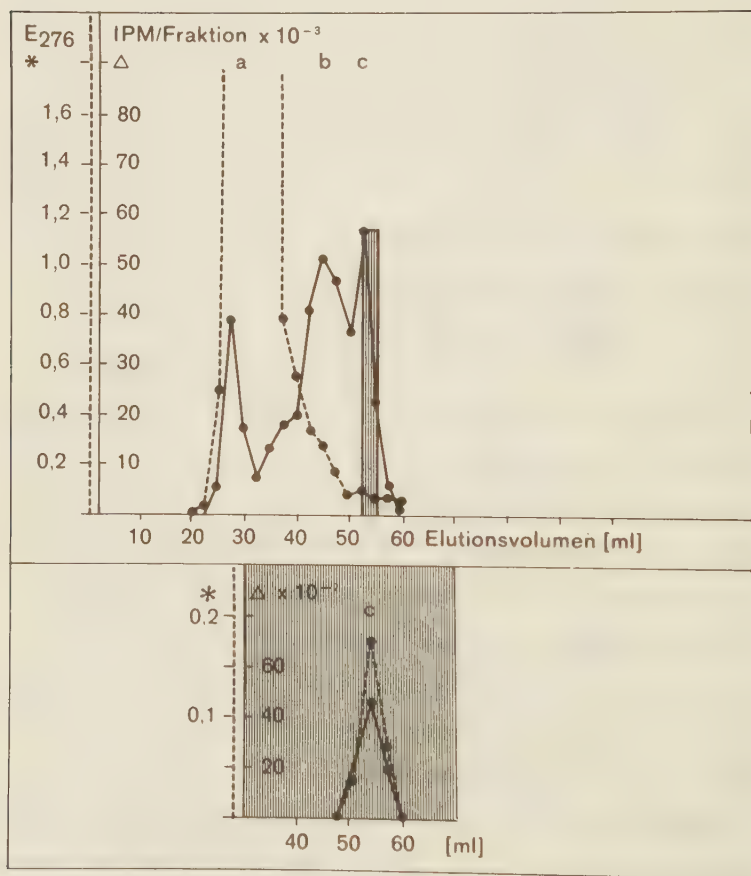


Abb.10: Trennung von Proinsulin und Insulin durch Gelfiltration des Säure-Alkohol-Extraktes eines 120 min perfundierten Rattenpankreas. Vorperfusionsmedium wie in Abb.6. Nach 30 min Perfusion mit ³H-Leucin und 400g% Glucose wurde das Medium gewechselt. Das neue Perfusionsmedium ohne ³H-Leucin-Zusatz enthielt 80 µg Puromycin/ml KRB. Die schraffiert gezeichneten Fraktionen wurden gepoolt und rechromatographiert.

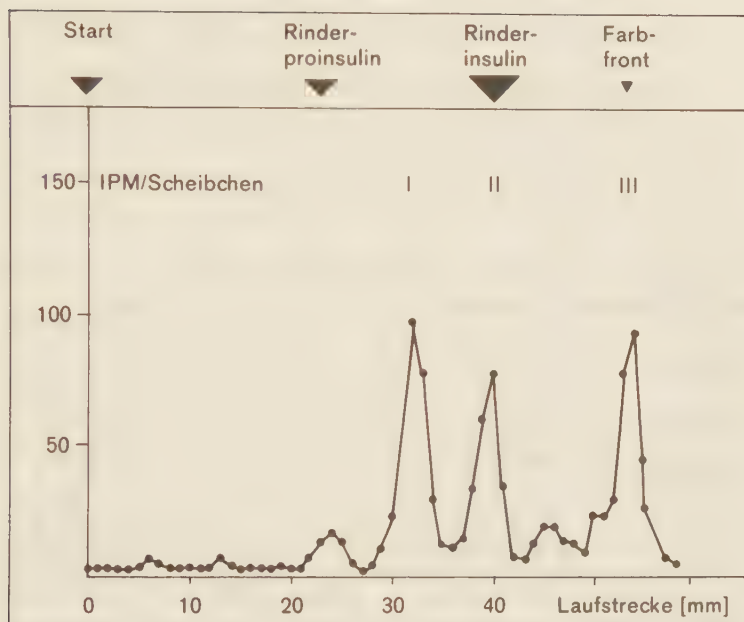


Abb.11: ^3H -Verteilung nach der Disc-Elektrophorese eines Aliquots des Peak c des Chase-Versuches. Als Referenzsubstanz diente Rinder-Insulin.

Zur weiteren Charakterisierung des durch Gelfiltration abgetrennten Proinsulin-Peaks b wurde die Einwirkung von Trypsin auf Proinsulin-Fractionen untersucht. Gepoolte Fractionen wurden gefriergetrocknet und mit Trypsin ($0,1 \mu\text{g}$, $1 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$ Trypsin / Ansatz) inkubiert. Die proteolytische Spaltung wurde durch Zugabe von 1n Essigsäure und 1n HCl gestoppt, der Inkubationsansatz anschließend auf Sephadex G-50 gelfiltrierte. Nach Trypsin-

spaltung war im Gegensatz zum Kontrollversuch im Proinsulin-Peak b praktisch keine Radioaktivität nachweisbar. 1 μ g Trypsin / Ansatz wandelte die Substanz des Peak b in eine Form um, die bei Gelfiltration mit Rinder-Insulin eluiert wurde (Abb.12).

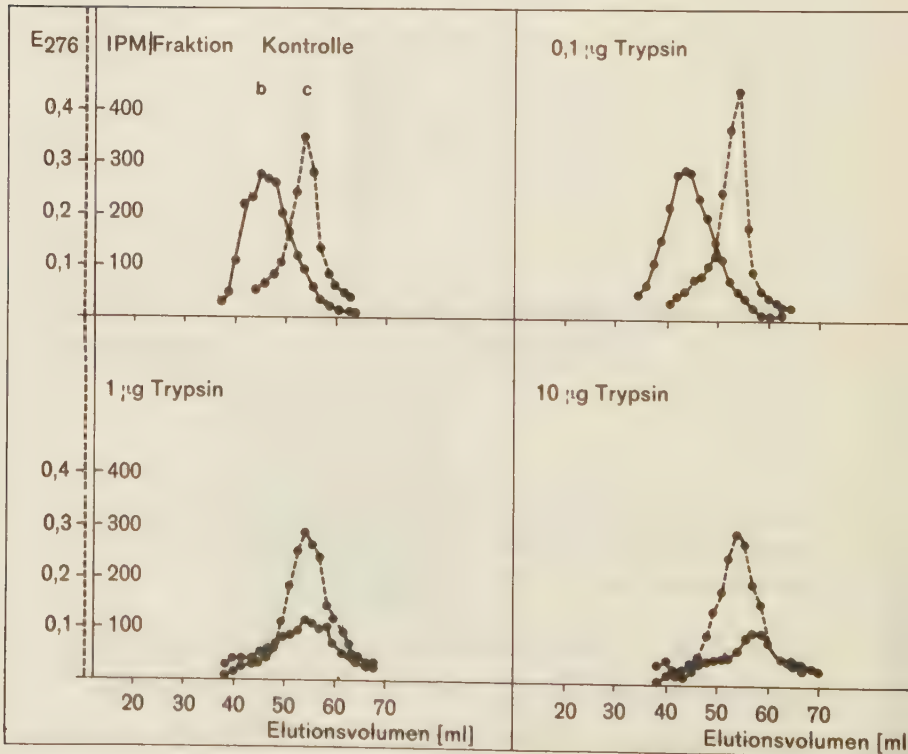


Abb.12: Gelfiltration aliquoter Teile des Peak b der 270 min Perfusion nach Trypsinspaltung.

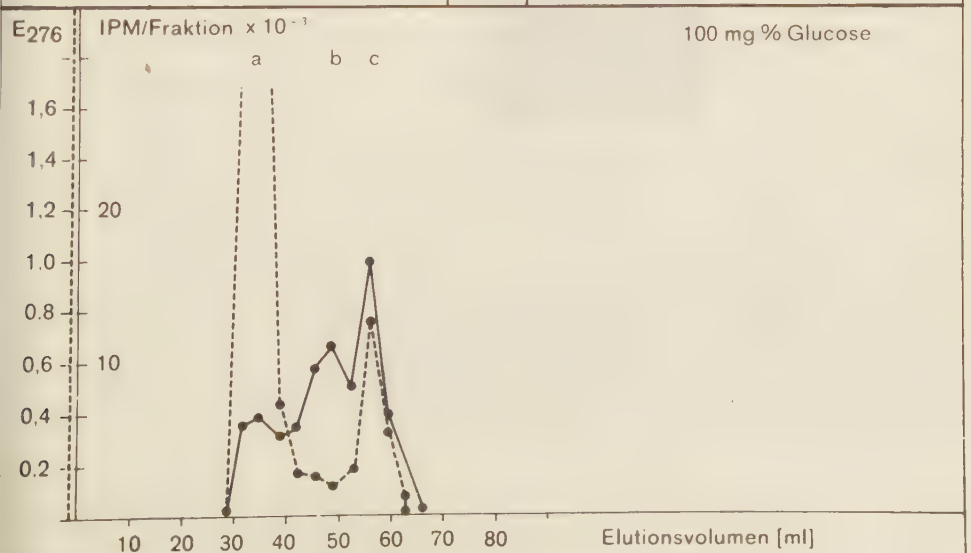
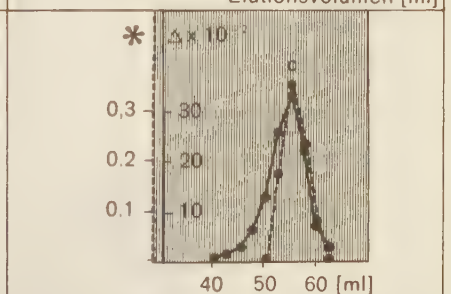
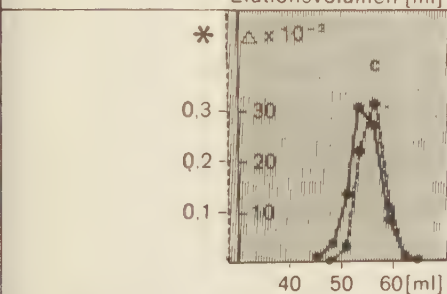
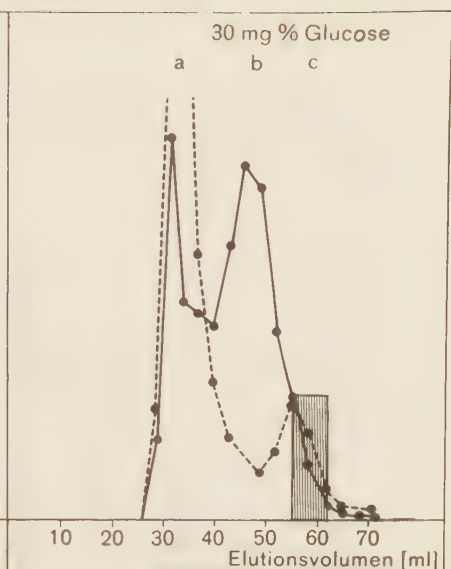
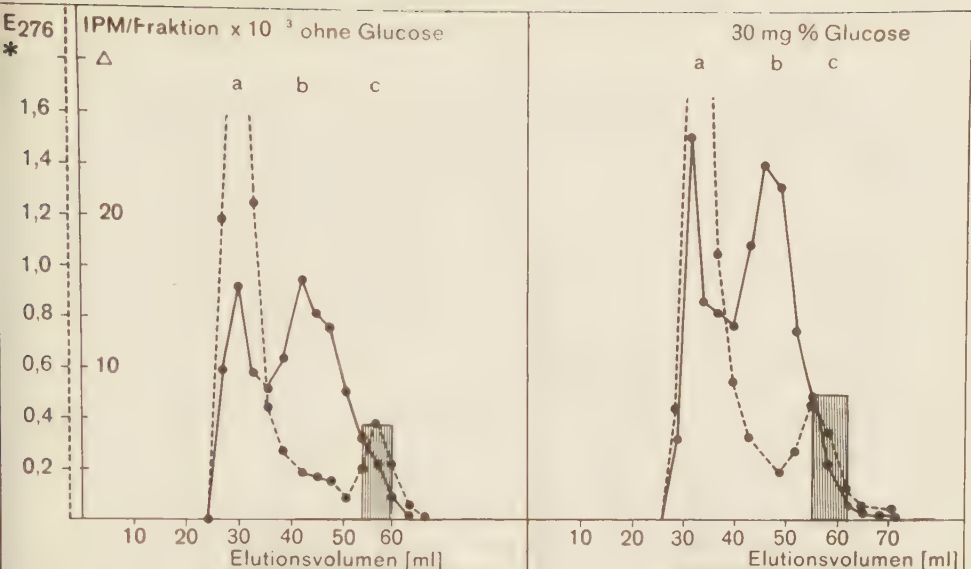
Einbau von ^3H -Leucin in TCE-unlösliches Material
in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration

Die bisher beschriebenen, der Charakterisierung der Reaktionsprodukte dienenden Versuche wurden bei gleichbleibender Glucosekonzentration von 400 mg% durchgeführt. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die den Einfluß unterschiedlicher Glucosekonzentrationen wiedergeben.

Rattenpankreatata wurden jeweils 240 min mit Medium durchströmt, das keine Glucose, 30mg% oder 100mg% Glucose enthielt (Abb.13). Bei Durchströmung mit 100mg% Glucose ist das Verhältnis der ^3H -Aktivität im Insulin- und Proinsulin-Peak ähnlich wie bei 270 min Perfusion mit 400 mg% Glucose (Abb.6). Bei Versuchen ohne Glucose bzw. mit 30 mg% Glucose wurde bedeutend weniger ^3H -markiertes Insulin gebildet. Die Insulinschulter konnte erst nach einer zweiten Gelfiltration abgetrennt werden. Es stellte sich heraus, daß die ^3H -Aktivität des elektrophoretisch isolierten Proinsulins des Peak b nach Perfusion ohne Glucose und mit 30 mg% Glucose bedeutend geringer ist, als nach Perfusion mit 100 mg% und 400 mg% Glucose. Daher ist anzunehmen, daß die Proinsulin-Synthese durch Glucosemangel gehemmt ist. Es wäre jedoch auch denkbar, daß Glucose ein bestimmtes Enzym aktiviert, das die Abspaltung des C-Peptids bewirkt und somit auch die Umwandlung von Proinsulin beeinflusst. Zur Klärung dieser Frage wurde bei einer weiteren Perfusion nach 30 min Durchströmung mit

400mg% Glucose die Proteinsynthese durch Puromycin gestoppt und die Perfusion 90 min fortgeführt. Hier wurde im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Chase-Versuch (Abb.10) nach Mediumwechsel ohne Glucose perfundiert. Würde die Umwandlung von Proinsulin in Insulin durch das Fehlen der Glucose im Perfusionsmedium gehemmt sein, könnte kein markiertes Insulin gebildet werden. Das nach 30 min Durchströmung mit 400mg% Glucose synthetisierte markierte Proinsulin könnte in den folgenden 90 min nicht in Insulin überführt werden. Nach Gelfiltration des Pankreasextraktes konnte jedoch ^3H -Radioaktivität im Peak c nachgewiesen werden; die Umwandlung von Proinsulin in Insulin erfolgte demnach auch ohne Glucose. Das Größenverhältnis von Peak b und Peak c stimmt mit dem des Chase-Versuches überein. Eine nur teilweise Hemmung der Umwandlung ist deshalb nicht anzunehmen.

Abb.13: Trennung von Proinsulin und Insulin durch Gelfiltration von Präparationen aus dem perfundierten Rattenpankreas. Das Vorperfusionsmedium enthielt keine Glucose, das Perfusionsmedium 100mg%, 30mg% oder keine Glucose, sowie 62,5 nC ^3H -Leucin / ml KRB. Die Perfusionszeit betrug 240 min. Die schraffiert gezeichneten Fraktionen wurden gepoolt und rechromatographiert.



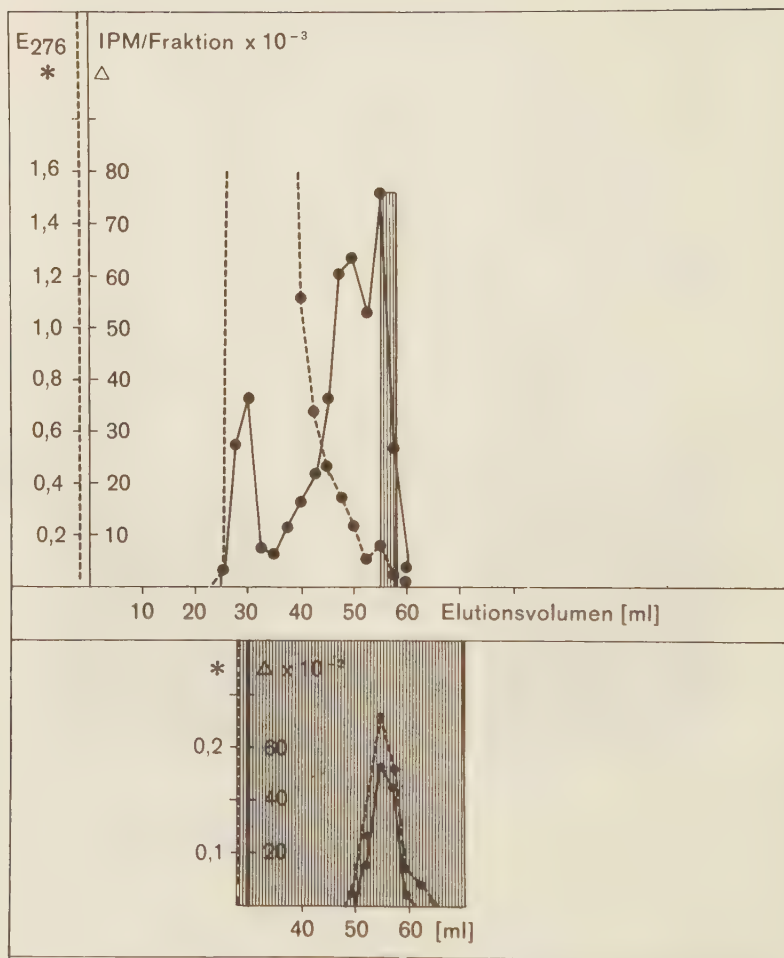


Abb. 14: Trennung von Proinsulin und Insulin durch Gelfiltration des Säure-Alkohol-Extraktes eines 120 min perfundierten Rattenpankreas. Versuchsanordnung wie in Abb.10 beschrieben, aber unter folgender Variation: nach Wechsel des Perfusionsmediums enthielt das neue Medium keine Glucose.

3.5. Sekretion von ^3H -markiertem Proinsulin und Insulin

In einem vorläufigen Versuch sollte untersucht werden, ob während der Perfusion bereits neu-synthetisiertes Proinsulin und Insulin sezerniert werden. Mit Hilfe der immunologischen Insulin-Bestimmung ist dies nicht möglich. Während der 270 min Perfusion mit 400mg% Glucose wurde nach 120 min Durchströmung das abtropfende Medium über 15-30 min Zeitintervallen gesammelt und die Proben wie beschrieben aufgearbeitet. Nach der Gelfiltration von Mediumextrakten wurde ^3H -Radioaktivität in Fraktionen eluiert, die denen von Proinsulin und Insulin entsprechen. Gegen Ende der Perfusion steigt der ^3H -Gehalt in diesen Fraktionen an (Tab.1). Dies kann durch eine Zunahme der Sekretion von markiertem Proinsulin und Insulin bedingt sein. Das Verhältnis der Impulse im Proinsulin- und Insulin-Peak bleibt dabei konstant. Genaue Aussagen über das Verhältnis von Proinsulin- und Insulin- Sekretion sind jedoch nicht möglich. Es bedürfte einer vorherigen eindeutigen Charakterisierung der ^3H -markierten sezernierten Verbindungen.

In 800ml Perfusionsmedium, das während des Perfusionszeitraums von 120-270 min das Pankreas durchströmte, konnten nach Extraktion und Gelfiltration der einzelnen Proben insgesamt 19000 Impulse im Insulin-Peak c gemessen werden. Das entspricht etwa 6% der ^3H -Radioaktivität des Peak c aus dem Pankreasextrakt dieser Perfusion (s.Abb.6, 270 min).

Perfusions- zeit (min)	^3H -IPM im Peak b / ml Medium	^3H -IPM im Peak c / ml Medium	^3H -IPM _{P.b} / ^3H -IPM _{P.c}
120 - 135	51	25	2,0
135 - 150	42	17	2,4
150 - 165	47	22	2,1
165 - 180	53	24	2,2
180 - 195	48	22	2,2
195 - 215	78	38	2,1
215 - 240	80	40	2,0
240 - 270	93	49	1,9

Tab.1: ^3H -Radioaktivität in Proinsulin-(Peak b) und Insulin-(Peak c) Fraktionen nach der Gelfiltration von Mediumextrakten der 270 min Perfusion.

In Abb.15 ist der Sekretionsverlauf von immunologisch reaktivem Insulin während der 270 min Perfusion dargestellt. Nach 180 min wird ein deutlicher Abfall der Sekretionsrate bemerkbar, der durch die lange Perfusionsdauer mit unphysiologisch hoher Glucosekonzentration bedingt sein kann.

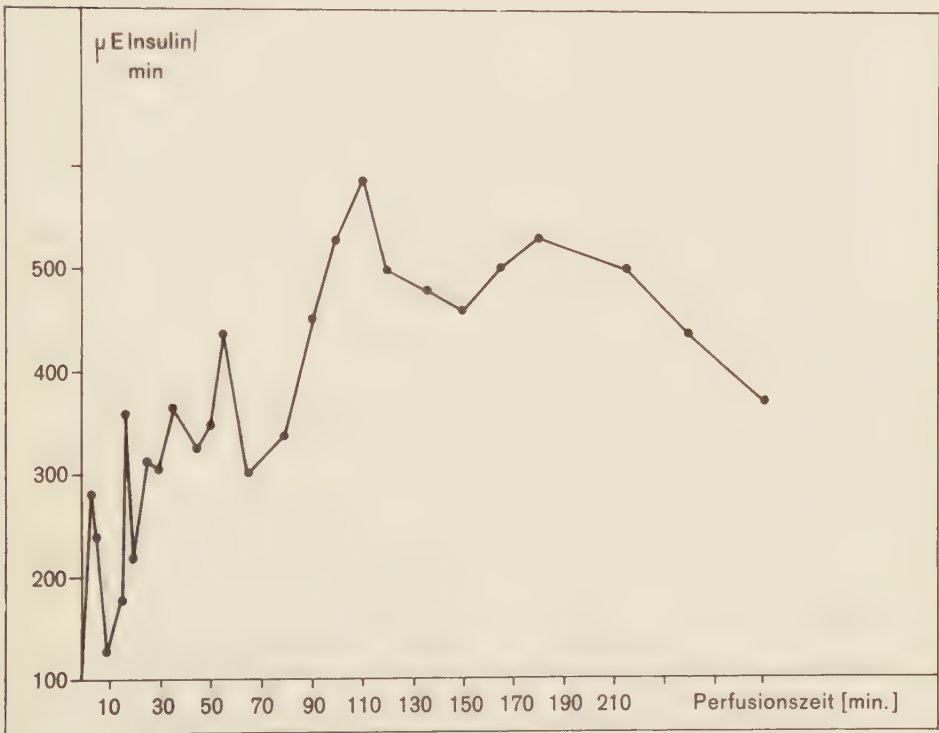


Abb.15: Sekretion von immunologisch reaktivem Insulin während der 270 min Perfusion. Das Perfusionsmedium enthielt 400mg% Glucose.

3.6. Inkorporationsversuche in vivo : Einbau von ^3H -Leucin in TCE-unlösliches Material des Rattenpankreas.

Da die Insulin-Biosynthese bisher ausschließlich an in vitro Systemen untersucht worden ist, wäre ein Vergleich mit in vivo Verhältnissen von großem Interesse. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die eine Markierung von Insulin in der Ratte bewirken sollten.

Männliche Wistar-Ratten (200-230g) wurden nach 16 Stunden Fasten $50\mu\text{C } ^3\text{H}$ -Leucin i.p. injiziert. Die Tiere wurden nach 1, 5, 8, und 16 Stunden durch Kopfschlag getötet. Das Pankreas wurde sofort entnommen und wie beschrieben aufgearbeitet. Die Pankreasextrakte von Tieren, die 1, 5 und 8 Stunden nach Injektion getötet wurden, zeigten nach Gelfiltration ^3H -Radioaktivität im Peak a und b, nicht aber im Peak c. Das Pankreas, das nach 16 Stunden entnommen wurde, wies weder Radioaktivität im Peak b noch im Peak c auf.

Einem Tier wurde $50\mu\text{C } ^3\text{H}$ -Leucin in die Schwanzvene injiziert und das Pankreas nach 1 Stunde entnommen. Nach Gelfiltration des Extraktes konnte auch hier kein markiertes Insulin nachgewiesen werden. Die ^3H -Verteilung entsprach der einer i.p. injizierten Ratte. Die Art der Applikation hatte demnach keinen Einfluß auf den Einbau von ^3H -Leucin in das Pankreas.

Da mit zunehmender Einwirkungsdauer des markierten Leucins in der Ratte die Radioaktivität im Peak b abnahm, könnte angenommen werden, daß im Falle der Identität des Peak b mit Proinsulin, dieses sofort nach der Umwandlung in In-

sulin sezerniert wurde. Polyacrylamid-Gelelektrophogramme von gepoolten Fraktionen des Peak b wiesen jedoch keine Radioaktivität im Proinsulin-Bereich auf. Dies spricht gegen ein Vorhandensein von markiertem Proinsulin. Dieses Ergebnis wurde durch einen weiteren Versuch bestärkt.

Nach Zerstörung der β -Zellen durch Streptozytozin sollte untersucht werden, ob auch unter diesen Bedingungen ^3H -Radioaktivität in Fraktionen des Peak b nachweisbar ist. Einer Ratte wurde vor der ^3H -Injektion 80mg Streptozytozin/kg Körpergewicht in verdünnter Citronensäure i.v. appliziert. Eine Stunde nach der i.p. ^3H -Injektion wurde das Tier getötet, das Pankreas wie üblich aufgearbeitet. Es zeigte sich eine genaue Übereinstimmung der ^3H -Verteilung mit der eines Kontrolltieres. Da auch trotz funktionsunfähiger β -Zellen Radioaktivität im Peak b eluiert wurde, ist seine Identität mit Proinsulin auszuschließen.

Beim Experiment in vivo ist die ^3H -Leucin-Konzentration, die auf das Pankreasgewebe einwirkt, im Gegensatz zur Pankreasperfusion nicht bekannt, da das injizierte ^3H -Leucin auch in andere Proteine und Peptide außerhalb des Pankreas eingebaut wird. Im Blut wird es zusätzlich durch unmarkiertes Leucin verschnitten. Es steht demnach dem Pankreas nur ein Bruchteil des applizierten ^3H -Leucins zum Einbau zur Verfügung. Da bei den oben beschriebenen Versuchen weder markiertes Proinsulin noch Insulin nachweisbar war, ist anzunehmen, daß die eingesetzte ^3H -Leucin-Aktivität zu gering war, um einen Einbau mit den hier benutzten Methoden nachzuweisen.

4. Diskussion:

Die vorliegenden Versuche zeigten, daß während der Perfusion des isolierten Rattenpankreas eine de novo Synthese von Insulin stattfindet. Dieses Präparat kann somit neben den schon eingangs erwähnten Systemen zum Studium der Insulin-Biosynthese benutzt werden.

Eine quantitative Aussage über die Linearität des Einbaus mit der Zeit ist schwierig, da dieser eine relativ weite Streuung besitzt. Wegen des großen Aufwandes konnten die einzelnen Versuche nicht genügend oft wiederholt werden, um die Ergebnisse statistisch abzusichern. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß bei Durchströmung mit ^3H -Leucin enthaltendem Medium in zeitlichem Nacheinander ^3H -markiertes Proinsulin und Insulin gebildet werden. Ferner konnte demonstriert werden, daß Insulin durch einen von Puromycin nicht hemmbaren Vorgang aus einer markierten Vorstufe, dem Proinsulin, entsteht.

Bei isolierten Ratteninseln war schon nach einer Inkorporationszeit von 150 min etwa gleich hohe Radioaktivität im Peak b und c messbar, beim perfundierten Rattenpankreas jedoch erst nach 270 min. Dieser zeitliche Unterschied könnte durch eine verzögerte Umwandlung von Proinsulin in Insulin bedingt sein. Es stellte sich jedoch heraus, daß er nur scheinbar ist. Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte ermittelt werden, daß der Proinsulinanteil im Peak b bei Perfusionen mit Glucosekonzentrationen 100mg% nur 20-30% beträgt. Der Rest stellt eine oder mehrere Verbindung(en) etwa gleichen Molekular-

gewichts dar. Da nach Extraktion eines in vivo inkubierten Pankreas, dessen β -Zellen zuvor mit Streptozytozin zerstört worden sind, ebenfalls ^3H -Radioaktivität im Peak b nachweisbar ist, kann angenommen werden, daß diese Verbindung(en) außerhalb der β -Zellen synthetisiert wurde(n). Diese Vermutung steht im Einklang mit Ergebnissen von Inkorporationsversuchen an Schnitten von β -Zell-tumoren und an isolierten Inselzellen (1,2). Steiner trennt durch Gelfiltration von Inselextrakten fast reines Proinsulin ab. Der Proinsulin-Peak b von Tumorextrakten enthält dagegen nur etwa 50% Proinsulin. Auch hier erreicht Peak c ebenso wie beim perfundierten Pankreas erst nach einer längeren Inkorporationsdauer gleiche Höhe wie Peak b.

Wie bereits an Pankreasschnitten und isolierten Inselzellen demonstriert, konnte auch am perfundierten Pankreas mit steigender Glucosekonzentration im Medium erhöhte Radioaktivität im Insulin gemessen werden. Mit den hier beschriebenen Versuchen wird bewiesen, daß die erhöhte Bildung von markiertem Insulin auf einer Steigerung der Proinsulin-Synthese beruht. Dieser Befund weist Parallelen zu Ergebnissen von Inkorporationsversuchen an isolierten Ratteninseln auf. Jarrett et al. (13,30) zeigten, daß die RNA-Synthese ebenfalls von der Glucosekonzentration abhängig ist.

Interessant wäre im Anschluß an diese Versuche die Frage, ob auch Antidiabetica die Insulin-Biosynthese regulieren. Es wurden bisher hauptsächlich deren Wirkung auf die Insulin-Sekretion untersucht.

Das bei der 270 min Perfusion nach 120 min Durchströmung bis Versuchsende gesammelte Medium enthielt 6 % der ^3H -Radioaktivität, die nach Pankreasextraktion im Peak c gemessen wurde. Unter der Voraussetzung, daß Peak c im Medium identisch mit Peak c im Pankreas ist, wurden innerhalb des angegebenen Zeitraums 6 % des während der Durchströmung synthetisierten Insulins ins Medium sezerniert. Der durchschnittliche Insulingehalt vergleichbarer Pankreata beträgt zur Zeit Null etwa $47\mu\text{g}$ (27). Die immunologische Insulinbestimmung ergab $3,1\mu\text{g}$ Insulinausschüttung während der 270 min; das entspricht 7 % des ursprünglichen Insulingehaltes von $47\mu\text{g}$. Diese Verhältnisse gestatten jedoch noch keine Aussage über die Art der Sekretion von neu-synthetisiertem Insulin. Es besteht die Möglichkeit, daß dieses sofort nach der Synthese ausgeschüttet, oder zuvor in Granula gespeichert wird und somit ein Auffüllen des sezernierten Depotinsulins bewirkt. Die Kenntnis der Konzentration von neu-synthetisiertem Insulin und Depotinsulin im Pankreas und Perfusionsmedium nach bestimmten Durchströmungszeiten ist zur Beantwortung dieser Frage dringend erforderlich.

Durch Vergleich des Insulingehaltes im Medium und Pankreas nach Perfusion bei gehemmter und ungehemmter Proteinsynthese kann die Konzentration von Depotinsulin und neu-synthetisiertem Insulin im Medium und Pankreas ermittelt werden. Würde das Verhältnis von neu-synthetisiertem Insulin zu Depotinsulin während einer bestimmten Betrachtungszeit größer als das im Pankreas sein, könnte auf eine bevorzugte Sekretion von neu-synthetisiertem Insu-

lin geschlossen werden. Da der methodische Teil dieser Arbeit sehr aufwendig war, konnten diese theoretisch angedeuteten Versuche nicht mehr in diesem Rahmen durchgeführt werden.

Besonders interessant wäre ein Vergleich der Insulin-Biosynthese bei diabetischen und normalen Tieren. Die Ratte ist für diesen Zweck ungeeignet, da sie nicht natürlich diabetisch wird. Unveröffentlichte Ergebnisse aus diesem Labor zeigen, daß das Pankreas des chinesischen Streifenhamsters aufbauend auf den methodischen Erfahrungen an der Ratte isoliert und erfolgreich durchströmt werden kann. Es wurde hier ebenfalls eine Synthese von Proinsulin und Insulin nachgewiesen. Inkorporationsversuche am spontan-diabetischen Streifenhamster müßten folglich durchführbar sein, mit deren Hilfe Anomalien im Syntheseprozess von Insulin erkannt werden könnten. Damit wäre die Bedingung für weitere Regulationsstudien gegeben, die wichtige Hinweise zur Diabetes-Therapie liefern könnten. Ebenso interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Sekretion von neu-synthetisiertem Insulin, insbesondere von Proinsulin.

5. Zusammenfassung

Durch Inkorporationsstudien mit ^3H -Leucin konnte gezeigt werden, daß auch am perfundierten Pankreas Proinsulin als Vorstufe des Insulins gebildet wird.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Insulin-Synthese von der Glucosekonzentration, die auf einer direkten Stimulierung der Proinsulin-Synthese beruhte. Eine beschleunigte Umwandlung von Proinsulin in Insulin fand durch Glucosestimulation nicht statt; die Umwandlung vollzog sich auch in Abwesenheit von Glucose.

Weiterhin wurde gezeigt, daß ^3H -markiertes Proinsulin und Insulin ins Perfusionsmedium sezerniert werden.

Da das Einhalten physiologischer Bedingungen in vitro nur näherungsweise gewährleistet ist, wurden Versuche unternommen, die Insulin-Biosynthese in vivo zu verfolgen. In Ermangelung geeigneter markierter Aminosäuren konnten diese nicht mit gewünschtem Erfolg durchgeführt werden. Ein Vergleich von Ergebnissen an in vitro Systemen mit solchen am lebenden Organismus war dadurch nicht möglich.

6. Literaturhinweise

1. STEINER, D.F., OYER, P.E.: The Biosynthesis of Insulin and a Probable Precursor of Insulin by a Human Islet Cell Adenoma.
Proc. Nat. Aca. Sci. 57, 473 (1967)
2. STEINER, D.F. et al.: Insulin Biosynthesis: Evidence for a Precursor. Science 157, 697 (1967)
3. CHANCE, R.E., ELLIS, R.M.: Proinsulin.
Arch. Intern. Med. 123, 229 (1969)
4. TUNG, A.K., YIP, C.C.: The Biosynthesis of Insulin and 'Proinsulin' in Foetal Bovine Pancreas.
Diabetologia 4, 68 (1968)
5. GRANT, P.T., REID, K.B.: Biosynthesis of an Insulin Precursor by Islet Tissue of Cod (*Gadus callarias*).
Biochem. J. 110, 281 (1968)
6. CHANG, A.Y.: Insulin Synthesis and Secretion by Isolated Islets of Spontaneously Diabetic Chinese Hamsters. Kongressbericht 1969.
7. TAYLOR, K.W. et al.: Biosynthetic Labelling of Mammalian Insulins in vitro. Nature 203, 1144 (1964)
8. HOWELL, S.L., TAYLOR, K.W.: The Secretion of Newly Synthesized Insulin in vitro.
Biochem. J. 102, 922 (1967)
9. HOWELL, S.L., TAYLOR, K.W.: Effects of Glucose Concentration on Incorporation of ^3H -Leucin into Insulin Using Isolated Mammalian Islets of Langerhans. Biochem. Biophys. Acta. 130, 519 (1966)

10. GUIDOUX-GRASSI, L. et al.: Leucin- ^{14}C Incorporation into Immunoreactive Insulin of Isolated Islets of Rat Pancreas in vitro. *Diabetologia* 4, 394 (1968)
11. LACY, P.E. et al.: Morphologic Aspects of Synthetic Process. *Diabetologia* 4, 179 (1968)
12. TAYLOR, K.W. et al.: The Biosynthesis of Insulin in vitro. *Diabetologia* 4, 179 (1968)
13. JARRETT, R.J. et al.: The Insulin Biosynthesis and RNA Metabolism Studied in Isolated Islets of Langerhans. *Diabetologia* 4, 394 (1968)
14. CLARK, J.L., STEINER, D.F.: Insulin Biosynthesis in the Rat: Demonstration of two Proinsulins. *Pre. N. A. S.* 62, 278 (1969)
15. HUMBLE, R.E. et al.: Studies on Isolated Islets of Langerhans (Brockmanbodies) of Teleost Fishes. *Biochem. Biophys. Acta* 74, 84, 96 (1963)
16. LAZAROW, A., BAUER, G.E. und LINDALL, A.: Protein Synthesis in Islet Tissue. in: *The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets*. Pergamon, London 1964, 203.
17. TRACK, N.S. et al.: Insulin Biosynthesis: Studies of Ribonucleicacid Metabolism in vitro in Isolated Surviving Mammalian and Fish Islets. *Biochem. J.* 109/3, 31p (1968)
18. BURR, I.M. et al.: Dynamic of Proinsulin Release from Perifused Rat Pankreas. *Lancet* 7626,II, 882 (1969)
19. SEVIER, B.R., WHITNEY, J.E.: Biosynthesis of Insulin by Isolated Perfused Dog Pancreas. *Diabetes* 16, 647 (1967)

20. WHITNEY, J.E. et al.: Effect of Growth Hormone and Glucose on ^{14}C Incorporation by the Perfused Dog Pancreas.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 488 (1968)
21. HALES, C.N. und RANDLE, P.J.: Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate.
Biochem. J. 88, 137 (1963)
22. ORNSTEIN, L. und DAVIS, B.J.: Annals. N. Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)
23. MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin 1968, 67, Tab.7.
24. PENHOS, J.C. et al.: A Rat Pancreas-Small Gut Preparation for the Study of Intestinal Factor(s) and Insulin Release. Diabetes 18, 733 (1969)
25. GREENE, E.C.: Anatomy of the Rat.
Hafner Publishing Company, New York and London 1963, 276
26. DAVOREN, P.R. et al.: The Isolation of Insulin from a Single Cat Pancreas.
Biochem. Biophys. Acta 63, 150 (1962)
27. CURRY, D.L. et al.: Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused Rat Pancreas.
Endocrinology 83, 572 (1968)
28. BASABE, J. et al.: Studies of Insulin Secretion in the Perfused Rat Pancreas. Diabetes 19, 271 (1970)
29. KANAZAWA, Y. et al.: Plasma Insulin Responses to Glucose in Femoral, Hepatic and Pancreatic Veins in Dogs. Amer. J. Physiol. 211, 442 (1966)
30. JARRETT, R.J. et al.: Glucose and RNA Synthesis in Mammalian Islets of Langerhans. Nature 11, 634 (1967)

Lebenslauf

24. 6. 1944 in Falkensee bei Berlin als drittes Kind
des Werbekaufmanns Leopold Brunner geboren.

1956 Umzug nach West - Berlin

1964 Abitur am Mathematisch Naturwissenschaftlichen
Zweig der Hildegard-Wegscheider-Schule, Berlin-
Wilmerdorf.

1964 - 71 Studium der Zoologie an der Mathematisch
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien
Universität Berlin.

1967 Ablegung der Diplom-Vorprüfung

1968 Zweimonatiger Studienaufenthalt am Institut der
Hyman Research Foundation, Washington D.C.

1969 - 71 Anfertigung der vorliegenden Dissertation
im Forschungszentrum der Schering AG, Berlin.

